

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780149

研究課題名(和文)腸内常在細菌叢の変化を介したアレルギー増悪機構の解明とアレルギー制御への展開

研究課題名(英文)Relationship between intestinal microbiota and allergy development - Novel target on allergy suppression by food

研究代表者

渡辺 純 (Watanabe, Jun)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・主任研究員

研究者番号：10374729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腸内常在細菌叢とアレルギー発症の関連性、授乳期の抗原摂取が仔の免疫応答に及ぼす影響について動物モデルを用いて検討した。D011.10マウスをOVAの経口投与により感作すると、腸内細菌叢が変化することがわかった。母が摂取した飼料が仔の腸内細菌叢形成にも影響し、ひいてはアレルギー発症にも影響する可能性が示された。さらに、授乳期に母が摂取した抗原は未分解のまま一部が母乳に移行し、仔を感作するが、それだけではアレルギー発症を惹起せず、生育後のアレルギー重症度にも影響しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the relationship between intestinal microbiota and allergy development and the effect of maternal allergen intake during lactating period on immune reactions in offspring. Microbiota was changed in the intestine of D011.10 mice, when those were sensitized by oral OVA administration. Maternal diet affected severity of allergic reactions probably via changing in the intestinal microbiota in offspring. Native antigen was observed in breast milk after the perinatal maternal exposure of oral antigen, with resulting sensitization in offspring. However, the sensitization was not enough to induce allergic reactions, and maternal allergen exposure did not affect the severity of allergic reactions after the additional sensitization.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食物アレルギー 腸内細菌 経母乳感作

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーや花粉症等、免疫系の失調に起因するアレルギー疾患は、とりわけ先進国を中心に増加の一途をたどっており、その対策が急務である。おもに乳幼児期に発症する食物アレルギーは、発育のみならず精神面にも影響を及ぼすばかりでなく、さらに他のアレルギー疾患の引き金になると考えられている。腸内の常在細菌叢が免疫系の発達や恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになり、プロバイオティクスやプレバイオティクスの投与による腸内常在細菌叢の改変によりアレルギー等の免疫疾患を予防・改善する試みが行われてきた。申請者らは、難消化性オリゴ糖の投与による腸内常在細菌叢の改変によりアレルギー疾患の症状改善が期待できることを、NC/Nga マウスにおけるアトピー性皮膚炎モデル、接触性皮膚炎モデル等を用いて解析してきた。

両親がアレルギー性喘息である場合、子のアレルギー性喘息発症リスクが高まることが報告されている (Angioni *et al* 1989)。また、発育初期の腸内常在細菌叢がアレルギー発症と密接な関係があること (Oyama *et al* 2001)、新生児の腸内常在細菌叢は母体の細菌叢を反映することが報告されている (Gronlund *et al* 1999)。これらの知見は、アレルギー感作・アレルギー疾患の発症によって腸内常在細菌叢が変化してアレルギーが増悪し、その腸内常在細菌叢が子へ受け継がれることを示唆する。花粉症患者において、花粉飛散期に腸内常在細菌叢が変化することが報告されている (Odamaki *et al* 2007)ものの、アレルギーへの感作・アレルギーの発症によって腸内常在細菌叢が変化し、さらにこの変化がさらにアレルギー増悪に寄与する可能性に言及した研究はほとんどない。この要因として、ヒトのアレルギー発症と同様にアレルギーの経粘膜投与により感作が成立し、即時型アレルギーを発症する動物モデルが乏しいことが挙げられる。我々は、鶏卵の主要アレルギーである卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウス DO11.10 を用い、OVA の経口投与のみによる感作により、アジュバントを用いずにアレルギー状態の誘導が可能であることを報告しており、本モデルはヒトのアレルギー発症を模した系であると考えている。

そこで本研究では我々独自の DO11.10 マウスによるアレルギー動物モデルを用いて、腸内細菌叢とアレルギーとの関連性に関する新たな知見を得ることを目的に研究を実施した。

2. 研究の目的

本申請研究では、上記の我々独自の DO11.10 マウスによるアレルギー動物モデルを用いて、抗原感作時あるいはアレルギー発症時の腸内常在細菌叢変化を解明し、この変

化がアレルギーの増悪に寄与するか検討するとともに、腸内常在細菌叢の改変を介したアレルギー制御のための基礎的知見を得ることを目的とし、以下の2点を中心課題として研究を実施した。

(1) 経口抗原感作による腸内常在細菌叢変化を明らかにし、さらにこの腸内常在細菌叢変化とアレルギー増悪との関連性を明らかにする

(2) 腸内常在細菌叢の改変によるアレルギー抑制の可能性を探る

(1)においては、抗原感作時の腸内常在細菌叢の変化をPCR-DGGE法により比較した。(2)においては、腸内常在細菌叢を変動させる因子として飼料の違いに注目し、異なる飼料を摂取させたDO11.10マウスの腸内常在細菌叢とアレルギー重症度の比較を行った。

さらに、(3)母の腸内細菌叢変化が仔のアレルギー発症に及ぼす影響を解析する中で、授乳期の母に投与した抗原が母乳を介して仔を感作する可能性が見られた。この現象について、当初の計画に追加して解析した。

3. 研究の方法

(1) 経口抗原感作による腸内常在細菌叢変化

10週齢の雄性DO11.10マウスに2% OVAを断続的投与(3日投与、4日休止、3日投与)あるいは連続的投与(6日間投与)した。対照群には水道水を投与した。飼料は市販非精製固形飼料(NMF, オリエンタル酵母)を自由摂取させた。OVA投与終了2日後に頸椎脱臼して屠殺し、盲腸内容物を得た。盲腸内容物からDNAを抽出し、rRNA断片を増幅して、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)によりバンドパターン解析を行った(Hernandez-Sanabria *et al* 2012)。

(2) 腸内常在細菌叢の改変によるアレルギー抑制の可能性

実験 1

3週齢の雄性DO11.10マウスにNMFあるいはAIN93G組成に基づく精製飼料を自由摂取させ、10週齢まで飼育した。10週齢時に2% OVA水を(1)と同様の方法で断続的投与して感作した。OVAの投与終了2日後に以下の方法によりアレルギー性皮膚反応を惹起し、アレルギー重症度を比較した。マウスをイソフルラン吸入麻酔下に背部皮膚を剃毛し、OVAを背部皮内に、蛍光トレーサーとしてFITC-BSAを尾静脈より投与した。30分後にイソフルラン吸入麻酔下に心採血して屠殺し、血清および背部皮膚の蛍光強度(ex 485 nm, em 530 nm)を測定して、皮内に漏出した血清相当量として皮膚炎重症度を表した(特許第4834819号)。また、盲腸内容物を採取し、(1)と同様の方法で常在細菌叢の比較を行った。

実験 2

3週齢の雄性および雌性DO11.10マウスにNMFあるいはAIN93G組成に基づく精製飼

料を自由摂取させ、10 週齢まで飼育した。10 週齢に達した時点で交配し、得られた仔にそれぞれ NMF あるいは AIN93G 組成に基づく精製飼料を自由摂取させた。仔が 10 週齢に達した時点で、と同様の方法で感作、アレルギー重症度の比較を行った。屠殺時に回収した盲腸内容物から DNA を抽出し、(1)と同様の方法で 16S rRNA 断片を増幅し、pGEM T-easy ベクターに挿入して、クローンライブラリを作成した。プラスミドを Templi Phi で増幅してシーケンスを解析し、Ribosomal Data Base Project II (rdp.cme.msu.edu) で常在細菌叢の分類を行った。

(3) 授乳期の抗原摂取が仔のアレルギー発症に及ぼす影響

8 週齢の BALB/c 雌性マウスと約 10 週齢の DO11.10 雄性マウスを交配し、DO11.10 (+/-) 仔マウスを得た。飼料は飼育期間を通じて NMF 固形飼料を自由摂取させた。出産直後から母に 2% OVA を(1)と同様に断続的あるいは連続的に合計 6 日間投与した。対照群には水道水を投与した。OVA 投与最終日に一部の仔マウスを頸椎脱臼して屠殺し、胃内容物を得た。胃内容物中の OVA を western blotting により検出した。仔マウスから経時的に採血し、ELISA により血清中の OVA 特異的抗体価を定量した。雄性の仔マウスを 10 週齢まで飼育し、実験 1 と同様の方法でアレルギー皮膚炎を惹起して、経母乳感作によりアレルギー症状が惹起されるか調べた。また、一部の雄性仔マウスには 10 週齢に達した時点で 2% OVA を(1)と同様の方法で断続的に投与して再感作し、実験 1 と同様にアレルギー性皮膚炎を誘導し、経母乳感作が生育後のアレルギー発症に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 経口抗原感作による腸内常在細菌叢変化

DO11.10 マウスに OVA を休止期間を設けて断続的に摂取すると感作が成立するが、休止期間を設けずに連続的に投与しても感作は成立しない。OVA 非投与の対照群と、OVA 連続的、断続的投与群から盲腸内容物を回収し、PCR-DGGE 法により菌叢を比較した(図 1)。その結果、対照群と OVA 投与群は異なるクラスターにわかれ、また断続的投与群と連続的投与群も異なる菌叢を有する可能性が示された。以上より、同量の OVA を摂取しても感作の有無で腸内細菌叢が異なる可能性が示された。今後、詳細な菌叢解析により感作により変動する腸内細菌の同定が必要と思われた。

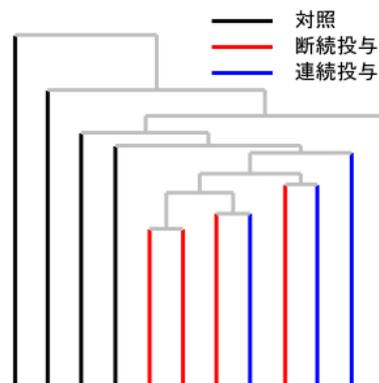


図 1 OVA の経口感作による腸内常在細菌叢の変化

(2) 腸内常在細菌叢の改変によるアレルギー抑制の可能性

腸内常在細菌叢を変動させる主要な要因として飼料の違いが考えられる。そこで、離乳直後の DO11.10 マウスに精製飼料あるいは非精製飼料を摂取させて飼育し、アレルギー重症度と腸内常在細菌叢を比較した。その結果、飼料の違いによって腸内常在細菌叢は顕著に異なる構成を示したが(図 2)、アレルギー重症度は群間に有意差が見られなかった(図 3)。

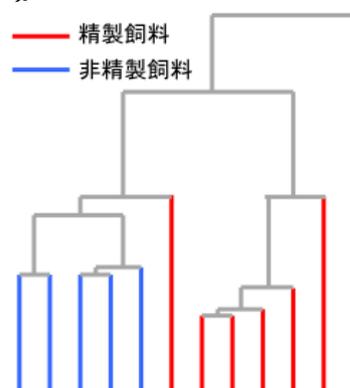


図 2 精製飼料および非精製飼料を摂取した DO11.10 マウスの腸内常在細菌叢の比較

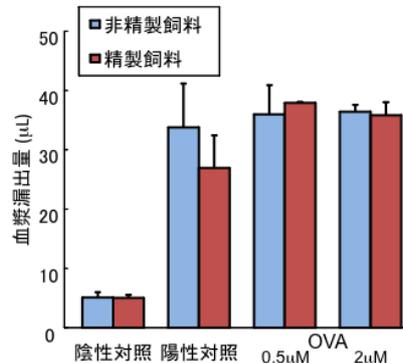


図 3 精製飼料および非精製飼料を摂取した DO11.10 マウスのアレルギー重症度の比較

新生児期の腸内常在細菌叢は母親の腸内常在細菌叢の影響を受けること、さらに免疫系の発達に重要であることが報告されている。前項において飼料の違いにより腸内常在細菌叢が変化することが示されたことより、

クロスオーバー試験を実施して母の腸内常在細菌叢変化を介して新生児期の腸内細菌叢を変化させ、アレルギーの抑制が可能か検討した。その結果、アレルギー重症度は仔が摂取した飼料の違いよりも母が摂取した飼料の違いが大きく影響することが示唆された(図4)。すなわち、母が精製飼料を摂取し、仔が非精製飼料を摂取した群(AIN-NMF群)で母が非精製飼料を摂取した2群(NMF-AINおよびNMF-NMF群)と比較して有意に皮膚炎症状が軽度となった。また、母も仔も精製飼料を摂取した群(AIN-AIN群)では皮膚炎症状の低減傾向が見られた。以上の結果は、飼料の違いにより母の腸内常在細菌叢が変化し、幼少期の腸内常在細菌叢の形成に影響を及ぼし、ひいては仔のアレルギー発症に影響する可能性を示唆するものであった。仔においてどのような腸内常在細菌叢の変化が起きているのかを調べるために、NMF-NMF群とAIN-NMF群の盲腸内容物からDNAを抽出し、16S rRNA断片を増幅した後、クローンライブラリを作成して菌叢の比較を行った。その結果、AIN-NMF群で顕著に増大するClostridium属のグループを見いだした(図5)。今後、このグループの増加とアレルギー発症抑制の関連性を調べる必要があると考えている。

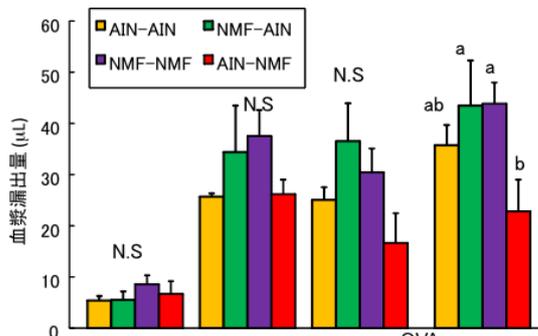


図4 飼料のクロスオーバー試験による幼少期の腸内常在菌叢変化が生育後のアレルギー発症へ及ぼす影響の解析

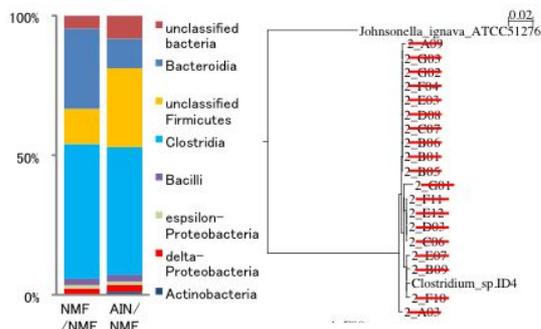


図5 飼料のクロスオーバー試験における仔世代の腸内常在細菌叢の比較

(3) 授乳期の抗原摂取が仔のアレルギー発症に及ぼす影響

母の腸内細菌叢変化が仔のアレルギー発症に及ぼす影響を解析する中で、授乳期の母

に投与した抗原が母乳を介して仔を感作する可能性が見られた。この現象について、当初の計画に追加して解析した。

雌性 BALB/c マウスと雄性 DO11.10(+/+)マウスを交配し、出産直後から母に2% OVA水を投与した。仔が2週齢時に胃内容物を回収し、内容物中のOVAを検出した。Western blottingにより未分解のOVAが母乳に含まれることが明らかとなった(図6)。仔の血清中OVA特異的抗体価の推移を観察したところ、母へのOVAの投与パターンに関わらず、母へOVAを投与しなかった対照群と比較して有意に高値を示した(図7)。BALB/cマウスに抗原を経口投与しても感作されないことから、母乳中に移行した抗原によって仔が感作されることが強く示唆された。母乳に移行した抗原によって仔が感作され、それによってアレルギー症状が惹起されるのか、仔が10週齢に達した時点で皮膚反応を実施して調べた。その結果、母へのOVAの投与の有無に関わらず、皮膚炎症状は惹起されなかった(図8)。また、仔が10週齢に達した時点で2% OVAを断続的に投与して再感作し、血清中の抗体価と皮膚炎症状の重症度を比較した。その結果、母へのOVA投与の有無はアレルギー重症度(図9)、再感作後の抗体産生量に影響しなかった(図10)。以上を総合すると、本モデルにおいては、授乳期に母が摂取した抗原は未分解のまま一部が母乳に移行し、仔を感作するが、それだけではアレルギー発症を惹起せず、生育後のアレルギー重症度にも影響しないことが示唆された。

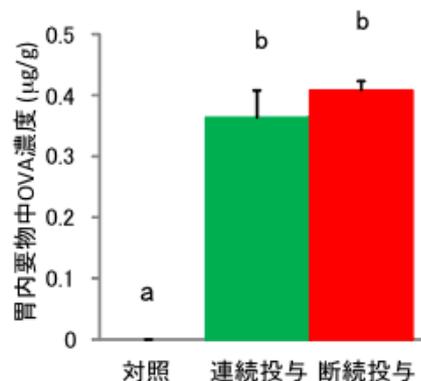


図6 仔の胃内要物中の未分解OVA濃度

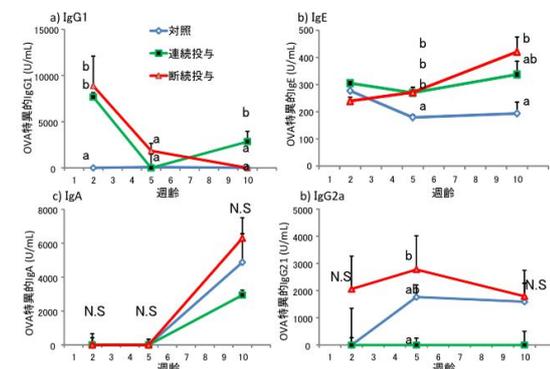


図7 仔の血清中OVA特異的抗体価の推移

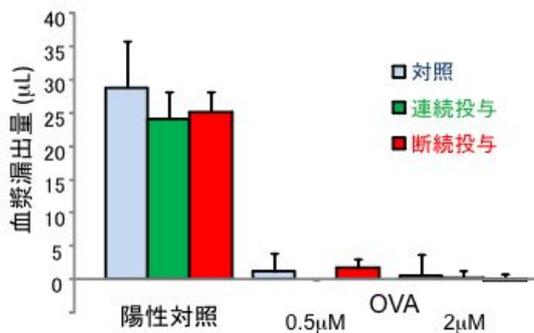


図 8 母乳中に含まれる抗原による仔の感作がアレルギー発症に及ぼす影響の解析

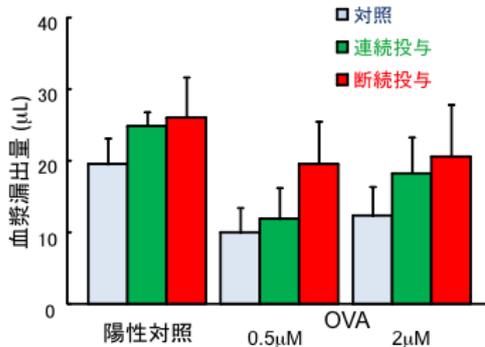


図 9 再感作後の仔におけるアレルギー性皮膚反応重症度

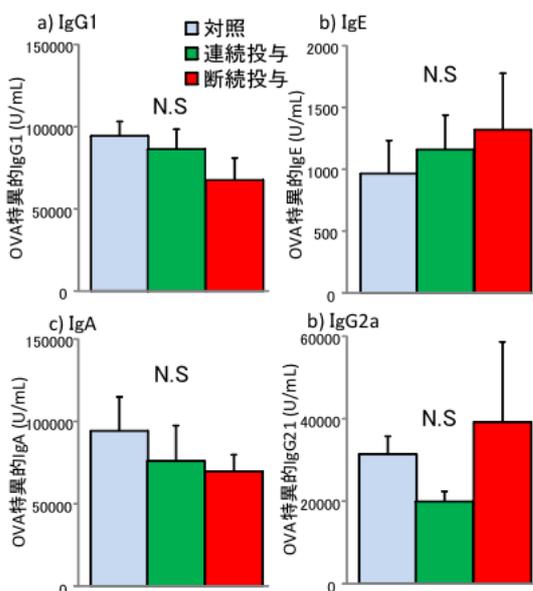


図 10 再感作後の仔における血清中 OVA 特異的抗体価

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

阿部麻里奈、渡辺純、後藤真生、石川(高野)祐子、授乳期の抗原摂取が仔の免疫応答に及ぼす影響の解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学(神奈川県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 純 (WATANABE Jun)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所・食品機能研究領域・主任研究員

研究者番号：10374729